

# 大動脈中膜平滑筋細胞培養に関する研究

## 第 1 編

### 加齢及び糖尿病ラット由来細胞における過酸化脂質の 細胞増生に対する影響について

岡山大学医学部第二内科学教室 (主任：木村郁郎教授)

石 岡 達 司

(昭和62年 4 月30日受稿)

**Key words** : 過酸化脂質, 大動脈中膜平滑筋培養  
糖尿病, 加齢

#### 緒 言

近年、動脈硬化発症の機序に関して多くの報告があるが、動脈硬化の好発する状態には加齢のみで他の疾患を認めない場合や糖尿病や高脂血症等ある種の疾患に合併する場合が臨床において認められる。また、動脈硬化症を有する症例においては八木等<sup>1)</sup>によって示されたごとく血清過酸化脂質が高値である事実や Glavind 等<sup>2)</sup>により認められた動脈硬化部位に過酸化脂質が多く含まれる事実がある。

Ross の障害説<sup>3)</sup>に従えば動脈硬化の発症は機械的<sup>4)</sup>、高血糖<sup>5)</sup>、ウイルス感染<sup>6)</sup>等による内膜細胞の障害に引き続く中膜平滑筋の内膜側への遊走や過増殖が最初の反応と考えられている。それゆえ、中膜平滑筋細胞の性質を確認することは非常に重要なことであるが、特に加齢のみに発症する動脈硬化症と糖尿病に合併する動脈硬化における平滑筋細胞の性質の差、更に過酸化脂質に対する平滑筋の反応性の差について検討することは興味ある課題である。

また、中膜平滑筋培養法<sup>7)</sup>は1970年代に確立した手法であるが平滑筋細胞そのものの性質を検討するには有用な実験法である。そこで今回、平滑筋細胞の性質を加齢と糖尿病について培養法を用いて検討するとともに過酸化脂質の影響について併せて検討したので報告する。

#### 実験材料並びに方法

##### 1. 動物及び飼育法

生後5ヵ月200g Wistar 系雄性ラットを使用し飼育条件はオリエンタル飼料及び水を自由に摂取可能、照明時間は、7時より18時室温22°C、湿度55%とした。飼育期間は、正常ラットは20ヵ月、またSTZ糖尿病ラットは12ヵ月とした。糖尿病ラット作製法：生後5ヵ月200g Wistar 系ラットにクエン酸 (PH4.5) にて溶解した STZ 65mg/kg を大腿静脈より投与し糖尿病ラットを作成した。

##### 2. 実験方法

##### A) 加齢ラット及び糖尿病ラット由来平滑筋細胞についての検討

正常ラットを自然に加齢させた状態で5, 6, 7, 9, 17, 25月齢のそれぞれのラットより大動脈を採取しそれぞれの月齢ラットに由来する平滑筋培養細胞系を6種類作製した。また、STZにより発症させた糖尿病ラットからも正常ラットと同様に5, 6, 7, 9, 17月齢すなわち、糖尿病罹病期間0, 1, 2, 4, 12ヵ月ラットに由来する平滑筋培養細胞系を5種類作製した。加齢ラット及び糖尿病ラット由来の平滑筋培養細胞の計10種類の系に対して細胞倍加時間、細胞内過酸化脂質、培養液過酸化脂質、培養液グリコシダーゼ活性を測定した。

### 1) 大動脈平滑筋細胞培養法

Rossの方法<sup>7)</sup>に準じ初代培養を行なった。すなわち、ラットを開胸後、胸部大動脈を大動脈弓部と横隔膜部をコッヘルにて挟みその両端を切断して摘出した。ただちに、70%エタノールにて消毒し4°CのPBSにて洗浄後、次に4°C PBS中にてコッヘルを外し外膜を分離した。その後、4°C RPMI 培養液中にて外膜を分離した大動脈を1 mm<sup>2</sup>の薄片に切断し、1つの薄片をP1シャーレに置きその上にカバーガラスをのせ20% FCS加RPMIを2 ml加え初代培養を行なった。培養条件は37°C, 95% air, 5% CO<sub>2</sub>とした。平滑筋細胞の確認は、hill and valleyの構造を以て行なった。継代培養は0.25%トリプシン-EDTA液にて平滑筋細胞を剥離後3×10<sup>4</sup>個/dishの割合でP-1シャーレに播き、培養液は10% FCS加RPMIを2 ml使用したが他の条件は初代培養と同一とした。尚、継代培養は初代培養開始4週後に始め、以後1週間隔にて行なった。実験には4-7継代を使用した。

### 2) 過酸化脂質測定法(培養液及び平滑筋細胞)

#### a) 培養液

八木法を一部変えて行なった。すなわち、培養液100 µlに1/12N硫酸4.0 ml, 10%リンタングステン酸0.5 mlを加え攪拌後室温に5分放置して3000 rpmにて10分間遠沈した。その沈渣に再度1/12N硫酸2.0 ml, 10%リンタングステン酸0.3 mlを加え、攪拌後遠沈を行なった。次に、沈渣を蒸留水4.0 mlにて、懸濁しTBA試薬(0.67% TBA-氷酢酸, 等量混液)を1 ml添加し95°C, 1時間油浴した。冷却後N-ブタノール5 mlにより抽出し、励起波長515 nm, 蛍光波長553 nmの条件により蛍光測定を行なった。単位はnmol MDA/mlに換算した。

#### b) 平滑筋細胞

真杉法を一部変えて行なった。即ち、実験に使用した1 dishの平滑筋細胞を0.25%トリプシン-EDTAにより平滑筋細胞を一つずつに分離したのち一部をトリパンプルーにより染色してBuerker-Tuerkにより細胞数を算定した。算定後の残り総ての細胞をPBSにて洗浄した後、7% SDS 0.2 mlを加え攪拌し次に1/10 N塩酸 2 ml, 10%リンタングステン酸0.25 ml TBA

試薬1 mlを加え95°C, 1時間油浴した。以下、培養液の過酸化脂質測定法と同様に測定した。また、単位はnmol MDA/10<sup>6</sup>個と換算した。

### 3) 倍加時間測定法

P-1シャーレ1 dishあたりに4-7継代の平滑筋細胞を3×10<sup>4</sup>個と種々の培養液2 mlを入れたdishを20 dish作製し、37°C, 95% air, 5% CO<sub>2</sub>の条件にて培養した。24時間ごとに5 dishのそれぞれの細胞数をトリパンプルー染色により連日4日間算定した。算定した細胞数を基にして2次回帰直線を想定し、成長曲線と倍加時間を求めた。

### 4) グリコシダーゼ活性測定法

Methoxyethanolにより溶解した10 mM 4-Methylumbelliferyl-β-D-glucuronide(または、10 mM 4-Methylumbelliferyl-N-acetyl-β-D-galactosaminideあるいは10 mM 4-Methylumbelliferyl-N-acetyl-β-D-Glucosaminide) 40 µl, 0.2 M Acetate buffer 1000 µl, 0.8% Triton X-100 500 µl, 蒸留水 500 µlにより作製したBufferの内100 µlと培養液100 µlを攪拌して37°Cにて10分間温浴し、直後にPH 10.4 0.05 M Glycine buffer 3 mlにて反応を停止したのち、蛍光分光光度計を励起波長340 nm 蛍光波長450 nmに設定して測定した。一方、標準は4-Methyl-umbelliferoneを使用して行なった。

#### B) アドリアマイシン添加実験

5ヵ月齢正常ラット由来平滑筋細胞を使用した。アドリアマイシン添加は、生理食塩水に溶解後、培養液に添加し最終濃度を10<sup>-8</sup> M, 10<sup>-9</sup> M, 10<sup>-10</sup> Mの3種類とし、生理食塩水のみを添加したものを対照とした。前述のごとく40 dishを作製し半数を細胞増生率(対照例に対する倍加時間の逆数比)に使用し他の半数を細胞内過酸化脂質、培養液過酸化脂質の測定に供した。

## 成 績

### 1. 加齢ラット及び糖尿病ラット由来平滑筋細胞における過酸化脂質について

大動脈を採取した時のラットの月齢に対応して加齢ラット及び糖尿病ラット由来中膜平滑筋培養細胞の細胞増生を示した。左側は平滑筋細

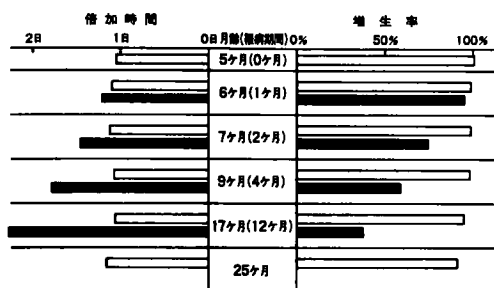


Fig. 1 加齢及び糖尿病ラット由来大動脈平滑筋培養細胞におけるラットの月齢（罹病期間）と細胞増生の関係 □：加齢ラット由来細胞 ■：糖尿病ラット由来細胞

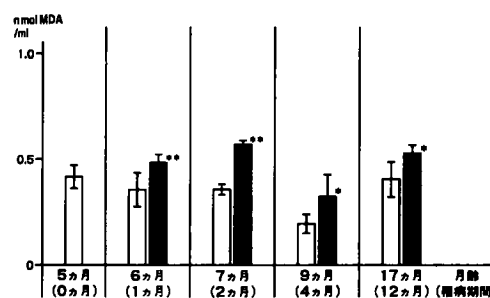


Fig. 3 加齢及び糖尿病ラット由来大動脈平滑筋培養細胞におけるラットの月齢（罹病期間）と培養液中過酸化脂質の関係 □：加齢ラット由来細胞 ■：糖尿病ラット由来細胞 (\*\*P<0.01 \*P<0.05)

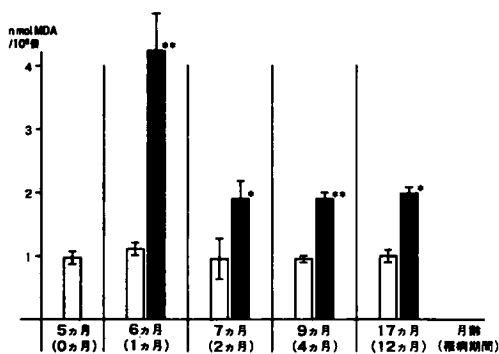


Fig. 2 加齢及び糖尿病ラット由来大動脈平滑筋培養細胞におけるラットの月齢（罹病期間）と細胞内過酸化脂質の関係 □：加齢ラット由来細胞 ■：糖尿病ラット由来細胞 (\*\*P<0.01 \*P<0.05)

胞の倍加時間を示し右側は同じ内容を正常5ヵ月ラット由来細胞を100%とした細胞増生率で示した。加齢ラットより採取し継代培養を行なった平滑筋細胞の倍加時間は生後5ヵ月齢1.10日、6ヵ月齢1.08日、7ヵ月齢1.10日、9ヵ月齢1.057日、17ヵ月齢1.11日、25ヵ月齢1.21日と加齢による影響を認めなかった。一方、糖尿病ラット由来平滑筋細胞では6ヵ月齢（罹病期間1ヵ月）1.08日、7ヵ月齢（罹病期間2ヵ月）1.69日、9ヵ月齢（罹病期間4ヵ月）1.90日、17ヵ月齢（罹病期間12ヵ月）2.40日であった。糖尿病ラット由来平滑筋細胞は、糖尿病発症2ヵ月後より倍加時間の増加即ち右側でみる増生率の低下が認められ4-12ヵ月の増生率はさらに低下した (Fig. 1)。

次に、大動脈を採取した時のラットの月齢に対応して、培養第4日目の加齢ラット及び糖尿病ラット由来中膜平滑筋培養細胞内過酸化脂質について検討した。加齢ラットより採取し継代培養を行なった平滑筋細胞の細胞内過酸化脂質は生後5ヵ月齢1.26nmol MDA/10<sup>10</sup>、6ヵ月齢1.25nmol MDA/10<sup>10</sup>、7ヵ月齢0.97nmol MDA/10<sup>10</sup>、9ヵ月齢0.73nmol MDA/10<sup>10</sup>、17ヵ月齢0.74nmol MDA/10<sup>10</sup>、25ヵ月齢0.64nmol MDA/10<sup>10</sup>と加齢による影響を認めなかった。一方、糖尿病ラット由来平滑筋細胞では6ヵ月齢（罹病期間1ヵ月）4.48nmol MDA/10<sup>10</sup>、7ヵ月齢（罹病期間2ヵ月）1.70nmol MDA/10<sup>10</sup>、9ヵ月齢（罹病期間4ヵ月）1.06nmol MDA/10<sup>10</sup>、17ヵ月齢（罹病期間12ヵ月）1.82nmol MDA/10<sup>10</sup>であった。正常ラット由来細胞は加齢にもかかわらず細胞内過酸化脂質には有意な変化を認めなかった。一方、糖尿病ラット由来細胞では常に加齢ラット由来細胞に比較して、細胞内過酸化脂質は高値であり特に糖尿病発症1ヵ月では、著明に増加し2-12ヵ月においても有意に増加した (Fig. 2)。

同様な検討を培養液過酸化脂質についても行なった。生後5ヵ月齢0.42nmol MDA/ml、6ヵ月齢0.35nmol MDA/ml、7ヵ月齢0.33nmol MDA/ml、9ヵ月齢0.20nmol MDA/ml、17ヵ月齢0.40nmol MDA/ml、25ヵ月齢0.19nmol MDA/10<sup>10</sup>とまったく有意差がなく加齢による影響を認めなかった。一方、糖尿病ラット由来

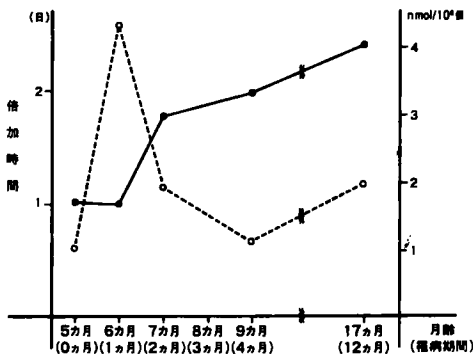


Fig. 4 糖尿病ラット由来細胞の倍加時間と細胞内過酸化脂質の関係について ○:倍加時間 ●:細胞内過酸化脂質

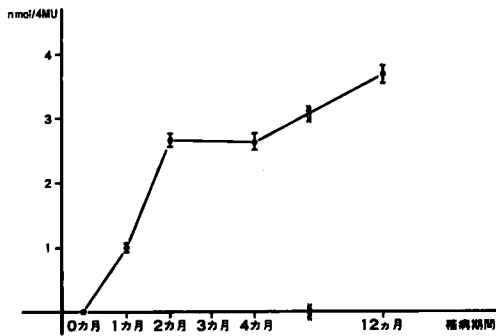


Fig. 5 糖尿病ラット由来細胞と細胞培養液中 N-acetyl-glucosaminidase について

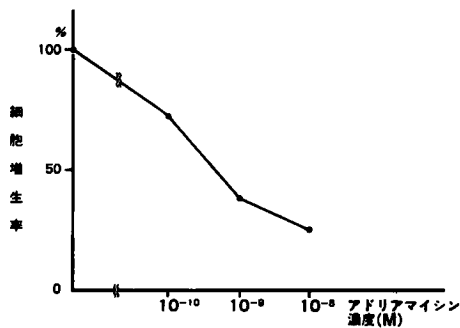


Fig. 6 大動脈平滑筋細胞培養の増殖率に対するアドリアマイシンの影響について

平滑筋細胞では 6ヵ月齢(罹病期間1ヵ月) 0.48 nmol MDA/ml, 7ヵ月齢(罹病期間2ヵ月) 0.55 nmol MDA/ml, 9ヵ月齢(罹病期間4ヵ月) 0.32 nmol MDA/ml, 17ヵ月齢(罹病期間12ヵ月) 0.52 nmol MDA/mlであり加齢ラット由来細胞と同様に培養液過酸化脂質は罹病期間によ

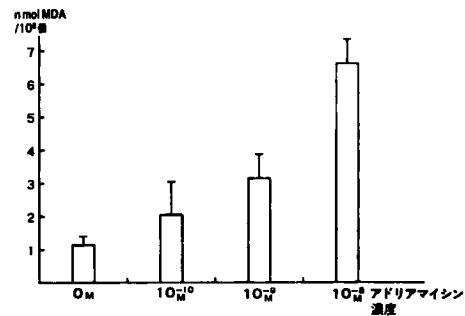


Fig. 7 大動脈平滑筋細胞内過酸化脂質に対するアドリアマイシンの影響について

る影響を受けなかったが、糖尿病ラット由来細胞はその対照にある加齢ラット由来細胞に比較して常に高値であった (Fig. 3).

細胞増殖と細胞内過酸化脂質の時間的推移を検討すると、罹病期間1ヵ月で細胞内過酸化脂質は異常に高値を示しその後より倍加時間が増加する (Fig. 4). 即ち、細胞内過酸化脂質の上昇にひきつづいて明かに細胞増殖が低下している。

最後に、それぞれの平滑筋細胞培養液のグリコシダーゼ活性を測定した。加齢ラット由来平滑筋では、3種のグリコシダーゼ活性がいずれも検出不能であった。一方、糖尿病由来平滑筋細胞培養液では3種のグリコシダーゼ活性のうち Glucosaminidase 活性のみ検出可能であった。すなわち、Glucosaminidase 活性は6ヵ月齢(罹病期間1ヵ月) 1.0 nmol/4 MU, 7ヵ月齢(罹病期間2ヵ月) 2.6 nmol/4 MU, 17ヵ月齢(罹病期間12ヵ月) 3.8 nmol/4 MUであり平滑筋細胞由来ラットの罹病期間に比例して増加した (Fig. 5).

## 2. アドリアマイシン添加の影響

細胞増殖率はコントロールに比較して培養液中アドリアマイシン濃度 $10^{-10}$  Mでは71%,  $10^{-9}$  Mでは37%,  $10^{-8}$  Mでは25%であった。細胞内過酸化脂質は、 $10^{-10}$  Mでは1.96 nmol MDA/ $10^6$ 個,  $10^{-9}$  Mでは2.79 nmol MDA/ $10^6$ 個,  $10^{-8}$  Mでは6.43 nmol MDA/ $10^6$ 個であった。即ちアドリアマイシン濃度の上昇に比例して細胞増殖は低下し (Fig. 6) 一方、細胞内過酸化脂質は増加した (Fig. 7)。培養液過酸化脂質は、アドリ

アマイシンの影響は認めなかった。

### 考 察

大動脈平滑筋培養を行ない加齢ラット由来平滑筋細胞と糖尿病ラット由来平滑筋細胞の性質の差について検討した。その結果、加齢ラット由来細胞においては細胞増生率についてほとんど加齢による影響を認めなかった。一方、糖尿病ラット由来平滑筋細胞では細胞増生率が罹病期間に比例して明らかに低下した。また、加齢および糖尿病由来平滑筋細胞の性質の差の一つとして細胞内過酸化脂質の含量が異なることが確認された。しかし、細胞内過酸化脂質が細胞増生に影響を及ぼすか否かについては、この点を検討した報告は少なく、ここで改めて細胞増生と細胞内過酸化脂質に関して考察を行なう。

平滑筋の細胞増生に影響を与える因子としては第一に遺伝子の変化を考える必要がある。STZ、糖尿病マウス<sup>8)</sup>やAlloxan糖尿病ラット<sup>9)</sup>を数世代選択交配することによって遺伝する糖尿病マウスやラットが作製できた事実やSTZ、Alloxanによる膵島細胞のDNAの断裂やPoly (ADP-ribose) synthetase 活性の亢進を認めた報告<sup>10)</sup>より考えて糖尿病ラット作製時に投与したSTZの影響が継代された平滑筋細胞に受け継がれたと考えることは可能である。また、環境条件を同じくした培養系において糖尿病ラット由来平滑筋の細胞増生の低下に一致して培養液のGlycosaminidase 活性が増加している事実も、遺伝子による影響を示唆するものである。しかしSTZによる影響のみによって細胞増生が低下したと考えるとすれば罹病期間の延長に逆相関して細胞増生が漸減するのは考えにくく、むしろ回復するはずである。

一方、遺伝子の他に細胞増生に影響をおよぼす外因子として、Cyclic AMP<sup>11)</sup>、ブドウ糖濃度<sup>12)</sup>、LDL-コレステロール濃度<sup>13)</sup>、血小板由来成長因子<sup>14)</sup>等の種々の因子<sup>15,16)</sup>が推測されるが、今回は、動脈硬化部位に過酸化脂質<sup>2,17)</sup>が増加していると言う報告に着目して細胞増生と過酸化脂質について検討した。その結果、糖尿病ラット由来平滑筋細胞において過酸化脂質の増加に引き続き細胞増生が低下する事実が得

られた。それゆえ、過酸化脂質と細胞増生の関係を確認する目的で抗癌剤の一種であるアドリアマイシンを培養液に添加した実験を行なった。

アドリアマイシン添加濃度に比例して細胞内過酸化脂質は増加し、一方、細胞内過酸化脂質と細胞増生は負の関係を示した。アドリアマイシンはDNA合成阻害効果を有するとともにマイクロゾーム中のNADPH-Cytochrome P 450を介して細胞内過酸化脂質を高めることが知られている薬剤<sup>18)</sup>であるため今回の細胞増生抑制効果がDNA合成阻害によるものか過酸化脂質の増加による二次的な現象かは不明である。しかし、今回使用したアドリアマイシンの濃度は一般臨床に使用する濃度に対してかなり低く、また平滑筋細胞がトリパンブルーにほとんど染色されなかった事実、或いは過酸化脂質と細胞増生の相関がアドリアマイシン濃度と細胞増生の相関より強い相関を有している点より考えて細胞内過酸化脂質が細胞増生に影響を及ぼしていると推測した。細胞内過酸化脂質が細胞増生の一部を調節していると考えれば加齢ラット由来細胞において細胞増生率が低下しなかった説明は容易である。

しかし、Goldstein<sup>19,20)</sup>はヒト皮膚繊維芽細胞培養において正常者由来細胞より糖尿病患者由来細胞の培養継代数の低下及び正常者由来細胞においても高齢者由来細胞が若年者由来細胞に比較して培養継代数が低下することを示した。この報告と今回の結果は一部矛盾するがラットはウサギやブタと異なり動脈硬化が発症しにくい性質を有する種<sup>21)</sup>である点、或いは、今回の実験が25ヵ月と短期間であった点を考慮すればこの矛盾点は理解できる。

Rossの提唱する障害説に従えば中膜平滑筋の内膜への遊走及び過増生が動脈硬化発症の初期段階と考えられているが、今回の糖尿病ラット由来平滑筋細胞では血管障害が進んだと考えられる罹病期間長期例において細胞増生の低下と言う興味ある結果が得られた。

吉田<sup>22)</sup>は、平滑筋培養法により中膜平滑筋と内膜平滑筋の性質の差を示唆し動脈硬化発症には内膜平滑筋が関与している可能性を示した。ただ、その内膜平滑筋がもともと内膜に存在す

るものか或いは内膜層へ遊走した中膜平滑筋がある時期を境にして変化, 変質したものは不明である. 今回の実験で観察した平滑筋が本来の中膜平滑筋であるのか或いは内膜平滑筋の性質を有しているのか現時点では判断が不可能である. しかし, 今回の細胞増生率の低下が動脈硬化発症よりむしろ血管障害部位の修復に働く能力が低下したと考えれば意義深い.

今後平滑筋の細胞増生と過酸化脂質の関係において抗酸化剤を含めた検討を行なえば動脈硬化の進展, 治療という立場で, 今回の結果がより意義深いものとなるであろう.

### 結 語

1) 大動脈平滑筋細胞培養において, 加齢ラット由来細胞の細胞増生率, 細胞内過酸化脂質はラットの加齢による影響を認めなかった.

2) 糖尿病ラット由来平滑筋細胞では細胞増生率が罹病期間に比例して明らかに低下し, 一方, 細胞内過酸化脂質は罹病期間に比例して増加した. また, 糖尿病由来細胞では, Glycosaminidase が加齢由来細胞では検出不能であったにも拘らず罹病期間に比例して増加した.

3) 正常5ヵ月ラット由来平滑筋細胞培養において, アドリアマイシン添加濃度に比例して細胞内過酸化脂質は増加し, 一方, 細胞増生は低下した.

稿を終わるにあたり, ご指導, ご校閲を賜りました恩師木村郁郎教授に深謝いたします. さらに直接ご指導, ご教示いただいた木畑正義講師に深謝いたします.

なお本論文の要旨は第26回日本糖尿病学会総会にて発表した.

### 文 献

1. Yagi K: A simple fluorometric assay for lipoperoxide in blood plasma. *Biochem Med* (1976) 15, 212-216.
2. Glavind J, Hartomann S, Clemmessen J, et al: Studies on the role of lipoperoxides in human pathology (II. The presence of peroxidized lipids in the atherosclerotic aorta.). *Acta pathol Microbiolol Scand* (1952) 30, 1-6.
3. Ross, R, et al: The pathogenesis of atherosclerosis. *N Engl J Med* (1976) 295, 369-377, 420-425.
4. Mcmillan DE: Physical factors important in the development of atherosclerosis in diabetes. *Diabetes* (1981) 30, (Suppl. 2) 97-104.
5. Keen H, Jarret RJ, Fuller JH and McCartiney P: Hyperglycemia and arterial disease. *Diabetes* (1981) 30, (Suppl. 2) 49-53.
6. Fabricant CG: Herpes virus induced atherosclerosis. *Diabetes* (1981) 30, (Suppl. 2) 29-31.
7. Ross R: The smooth muscle cell. Growth of smooth muscle in culture and formation of elastic fibers. *J cell Biol* (1971) 50, 172-186.
8. 柴田昌夫, 岸 常規, 安田文二他: 新しい Strain と考えられる NSY マウスの病態について, 糖尿病, 21: *supplemente* (1978) 293.
9. 岡本耕三: 糖尿病子孫動物における糖尿病素因の生成と糖尿病自然発症. 糖尿病 (1960) 3, 33-47.
10. Yamamoto H, Uchigata Y and Okamoto H: Streptozotocin and alloxan induce DNA strand breaks and poly (ADP-ribose) synthetase in pancreatic islets. *Nature* (1981) 294 (19), 284-286.
11. Kishi Y, Nishiyama K and Numano F: Cyclic AMP accumulation in rabbit aorta smooth muscle cells cultured in the presence of hyperlipidemic serum. *Atherosclerosis* (1985) 56, 213-222.
12. Ledet T, Dzoga KF and Wissler R: Growth of rabbit aortic smooth muscle cells. Culture in media containing diabetic and hyperlipemic serum. *Diabetes* (1976) 25, 207-215.

13. Fischer Dzoga KFR and Wissler R W: Stimulation of Proliferation in stationary primary cultures of monkey and rabbit smooth muscle cells. 1. Effects of lipoprotein fractions of hyperlipemic serum and lymph. *Exp Mol Pathol* (1976) 24, 346-359.
14. Ross R, Glomset J and Kariya B: A platelet dependent serum factor that stimulates the proliferation of arterial smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci* (1974) 7, 1207-1210.
15. Nakao J, Ooyama TH and Ito H: Comparative effect of lipoxygenase products of arachidonic acid on rat aortic smooth muscle cell migration. *Atherosclerosis* (1982) 44, 339-342.
16. Morisaki N, Lindsey TA and Stiffs TM: Fatty acid metabolism and cell proliferation. Evaluation of pathways for the generation of lipid peroxides. *Lipid* (1984) 19, 381-394.
17. 福住一雄, 岩田圭明: アテローム性動脈硬化症血管の脂質 (第2報) 腹部大動脈脂質の透析と大動脈に存在する脂質-タンパク質複合体の脂質. *油化学* (1963) 12, 93-97.
18. Mimnaugh ED, Trush MA and Gram TE: Stimulation by adriamycin of rat heart and liver microsomal NADPH-dependent lipid peroxidation. *Biochem Pharmacol* (1981) 30, 2797-2804.
19. Samuel Goldstein: Chronologic and physiological age effect replicative life span of fibroblast from diabetic, prediabetic and normal donors. *Science* (1978) 199, 781-782.
20. Goldstein S: Diabetes mellitus and aging; Diminished plating efficiency of cultured human fibroblast. *Proc Natl Acad Sci* (1969) 64, 155-160.
21. Hadjiisky P, Renais J and Scebat L: A comparative study of the arterial tissue metabolism in atherosensitive and atheroresistant species. Comparison between rabbit and rat aorta. *Paroi Arterielle/Arterial Wall*. 7, 155-166.
22. 吉田洋二: 動脈内膜細胞. *動脈硬化* (1984) 12, 1033-1039.

**Studies on aortic medial smooth muscle cell culture**  
**Part 1. The effects of lipid peroxides on cell proliferation**  
**in cells derived from aged or diabetic rats**

**Tatsuji ISHIOKA**

**Second Department of Internal Medicine Okayama University Medical School**

**(Director: Prof. I. Kimura)**

The cultured smooth muscle cell offers several advantages to investigation of cell character. It can be utilized to make studies on aging and atherosclerosis. This work was carried out to investigate the effects of intracellular lipid peroxides and aging on the growth rate of cultured aortic medial smooth muscle cells obtained from normal rats and rats with streptozotosin-induced rats.

Cells from young and old rats showed similar growth and contained the same amount of intracellular lipid peroxides. However the rate of growth of cells from diabetic rats was inversely proportional to the period of illness and also to the quantity of lipid peroxides contained in the cells. When normal cells were cultured in an adriamycin-containing medium, their growth rate was inversely proportional to the adriamycin concentration of the medium and also the amount of intracellular lipid peroxides.